

# BUNDESREPUBLIK DEUTSCHLAND



REC'D 08 APR 1993	
WIPO	PCT

**PRIORITY DOCUMENT**  
Bescheinigung

Die DIAGEN Institut für molekularbiologische Diagnostik GmbH in 4010 Hilden hat eine Patentanmeldung unter der Bezeichnung

"Verfahren zur Bestimmung von in vitro amplifizierten Nukleinsäuresequenzen"

am 5. Februar 1992 beim Deutschen Patentamt eingereicht.

Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ursprünglichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.

Die Anmeldung hat im Deutschen Patentamt vorläufig die Symbole G 01 N 33/68 und C 12 Q 1/68 der Internationalen Patentklassifikation erhalten.

München, den 15. Februar 1993  
Der Präsident des Deutschen Patentamts

Im Auftrag

K. Konvalin

P 42 03 178.8

Patentanwälte Patent Attorneys  
VON KREISLER SELTING WERNER

Deichmannhaus am Hauptbahnhof  
D-5000 KÖLN 1

DIAGEN  
Institut für molekular-  
biologische Diagnostik GmbH  
Max-Volmer-Str. 4  
4010 Hilden

Patentanwälte  
Dr.-Ing. von Kreisler † 1973  
Dipl.-Chem. Alek von Kreisler  
Dipl.-Ing. Günther Selting  
Dr. Hans-Karsten Werner  
Dr. Johann F. Fues  
Dipl.-Ing. Georg Dallmeyer  
Dipl.-Ing. Jochen Hilleringmann  
Dr. Hans-Peter Jönsson  
Dr. Hans-Wilhelm Meyers

04. Februar 1992

Me/kk 920186de

"Verfahren zur Bestimmung von in vitro  
amplifizierten Nukleinsäuresequenzen"

Telefon: (02 21) 13 10 41  
Telex: 888 2307 dopa d  
Telefax: (02 21) 13 42 97  
(02 21) 13 48 81  
Telegramm: Dompotent Köln

Konten / Accounts:  
Sal. Oppenheim jr. & Cie., Köln (BLZ 370 302 00) Kto. Nr. 10 760  
Deutsche Bank AG, Köln (BLZ 370 700 60) Kto. Nr. 1165 018  
Post giro Köln (BLZ 370 100 50) Kto. Nr. 654-500

"Verfahren zur Bestimmung von in vitro  
amplifizierten Nukleinsäuresequenzen"

Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist ein Verfahren zur Bestimmung von mindestens einer in vitro amplifizierten Nukleinsäuresequenz in einem Reaktionsraum, eine Vorrichtung, die zur Durchführung des erfindungsgemäßen Verfahrens geeignet ist, sowie Mittel zur Durchführung des erfindungsgemäßen Verfahrens.

Die moderne Analytik greift zunehmend auf molekularbiologische Grundprinzipien zurück. Mit der Polymerase Ketten Reaktion (PCR) ist in jüngster Zeit ein sehr nützliches Werkzeug für die Analytik mittels molekularbiologischer Grundlagen gefunden worden, die sich auf allen Gebieten der Analytik, in denen Nukleinsäuren eine direkte oder indirekte Rolle spielen, angewendet werden kann.

Die PCR-Analytik (R.K. Saiki et al. (1988) Science 239, 487 - 491) und andere enzymatische Amplifikationstechniken (J.C. Guatelli et al. (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. 87, 1874 - 1878) sind prinzipiell in der Lage, niedrigste Titer von DNA- oder RNA-Kopien in einer wäßrigen Lösung nachzuweisen. Letztlich ist eine einzige Kopie ausreichend für eine enzymatische Amplifikation. Allerdings haben sich eine Reihe praktischer Schwierigkeiten bei der routinemäßigen qualitativen Anwendung herausgestellt sowie bei dem Bestreben, PCR mit einer quantitativen Kopienzahl-Bestimmung zu verbinden. Die Schwierigkeiten der Amplifikationsanalytik stehen im Zusammenhang mit:

- Unerwünschter Amplifikation durch Fehlpriming,
- ungleichmäßiger Verbrauch der Primer,
- Heteroduplex-Bildung,
- schwankende Zykluseffizienzen,
- diverse Amplifikationsartefakte,
- Quantifizierungsproblematik,
- Kontaminationsgefahr,
- "falsch positive" Resultate,
- "falsch negative" Resultate,
- Testkosten,
- Serienreife,
- Aufwand in der Handhabung, verglichen mit immuno-  
logischen ELISA-Verfahren für die Proteinanalytik.

Die WO 91/02815 beschreibt einen sicheren qualitativen und quantitativen Nachweis spezifischer DNA und RNA aus biologischem Probenmaterial mit Hilfe einer DNA/RNA-Amplifikationsmethode in Kombination z. B. mit der Temperaturgradienten-Gelelektrophorese (TGGE) (siehe auch K. Henco & M. Heibey (1990) Nucleic Acids Res. 19, 6733 - 6734, J. Kang et al. (1991) Biotech Forum Europ 8, 590 - 593, G. Gilliland et al. Proc. Natl. Acad. Sci. (1990) 87, 2725 - 2729).

Mit der in der WO 91/02815 beschriebenen Amplifikationsstrategie ist es gelungen, die Sensitivität der Amplifikationstechniken mit einer sicheren und äußerst genauen Quantifizierung zu verbinden (Variation  $\pm$  15%). Die Methode ermöglicht es, die oben genannten Probleme, wie sie sich bei Amplifikationsverfahren ergeben, zu kontrollieren bzw. zu unterdrücken. Mit der Verwendung eines nahezu idealen internen Standards definierter Kopienzahl, der sich nur in einer einzigen Basenposition von dem zum bestimmenden Template unterscheidet, läßt sich eine Amplifikation unter Beibehalt des initialen Verhältnisses von Template und Standard durchführen (K. Henco & M.

Heibey ((1990) Nucleic Acids Res. 19, 6733 - 6734). Template und Standard werden nachträglich in einem Temperaturgradientenverfahren mit zeitlichem oder räumlichem Temperaturgradienten im gelelektrophoretischen System durchgeführt. Das Verhältnis von Template und Standard läßt sich einfach ermitteln, indem das Reaktionsgemisch mit einem radioaktiv markierten oder fluoreszenzmarkierten Standard hybridisiert wird. Die ansonsten störend auftretende Heteroduplex-Bildung kann in diesem System das Ergebnis nicht verfälschen. Vielmehr wird die Heteroduplex-Bildung zur eigentlichen Messung herangezogen.

Übliche Probleme durch ungleichmäßigen Verbrauch der Primer, Fehlpriming-Reaktionen, Sättigungseffekte, Variationen in der Effektivität der Amplifikationen, haben keinen negativen Einfluß auf das Quantifizierungsergebnis.

Diese Technologie wurde auf wichtige analytische Fragestellungen in der Medizin angewandt. So ist es beispielsweise möglich geworden, die Cytomegalie-Infektion bzw. -Virämie bei transplantierten Patienten oder Neugeborenen quantifizierend zu erfassen. Hier hat sich das Verfahren besonders bewährt, denn angesichts einer stellenweise mehr als 90%-igen Infektionsrate in den europäischen Staaten ist der reine Nachweis von Cytomegalie-Viren nicht bedeutungsvoll, sofern nicht gleichzeitig eine Titer-Bestimmung durchgeführt wird, die den akuten Zustand einer Virämie anzeigt. Bei viralen Erkrankungen gewinnt der quantifizierende Aspekt an Bedeutung, insbesondere im Zusammenhang mit den im verstärkten Maße angewandten antiviralen Therapie-Schemata. Häufig sind antivirale Therapien, wie zum Beispiel im Falle von HIV mit AZT für den Patienten systemisch äußerst belastend und als antivirales Therapeutikum nur über einen limi-

tierten Zeitraum erfolgreich einzusetzen. Deshalb wird es für die Zukunft sehr bedeutsam sein, eine wirtschaftliche und einfache Technik zu haben, die sowohl eine Titer-Bestimmung bzw. eine Bestimmung der Virusgen-Aktivität oder einen Therapie-induzierten Drift zu resistenten Virusstämmen anzeigt.

Die bislang angewandten gelelektrophoretischen Methoden zur Auftrennung der markierten Homoduplices und Heteroduplices haben sich bei kleinen bis niedrigen Probenzahlen (10 - 20) als äußerst effizient und korrekt bezüglich der gelieferten Ergebnisse herausgestellt. Ein gravierender Nachteil ist jedoch die relativ zeit- und personalaufwendige Analysentechnik, die den Einsatz dieses höchst aussagefähigen Analyseverfahrens als generelle Diagnostik-Methode für die DNA- und RNA-Analytik stark erschwert. Es ist nur schwer vorstellbar, daß mit der TGGE-Technik Probenzahlen > 50 pro ausführender Person und Tag durchgeführt werden können. Auch eine Automatisierung ist schwer zu erreichen.

Aufgabe der vorliegenden Erfindung ist es mithin, ein Verfahren bereitzustellen, daß die oben erwähnten Nachteile der Verfahren gemäß dem Stand der Technik vermeidet, insbesondere das Nachweisverfahren so auszugestalten, daß keine gelelektrophoretische Trennung erforderlich ist, um somit eine einfachere und automatisierbare Verfahrensweise zu gewährleisten. Gleichzeitig soll eine Vorrichtung geschaffen werden, die es erlaubt, die mit dem erfindungsgemäßen Verfahren detektierten amplifizierten Nukleinsäuresequenzen sicher und einfach zu erkennen, wobei die Vorrichtung ebenfalls eine weitestgehend automatisierbare Auswertung erlauben soll.

Erfindungsgemäß gelöst wird die Aufgabe durch ein Verfahren zur Bestimmung mindestens einer in vitro ampli-

fizierten Nukleinsäuresequenz in einem Reaktionsraum, wobei während oder nach der Amplifizierung der Nukleinsäuresequenz mindestens eine Substanz vorhanden ist, deren spektroskopisch meßbare Parameter mit der nachzuweisenden Nukleinsäuresequenz in Wechselwirkung treten, dabei ein meßbares Signal erzeugt wird, die zu messende Probe der Einwirkung eines Gradienten ausgesetzt wird, der Nukleinsäuren mindestens teilweise denaturieren kann, unter Erfassung des sich durch die Einwirkung des Gradienten ändernden meßbaren Parameters.

Die Substanz, deren Parameter spektroskopisch meßbar sein soll, enthält vorzugsweise mindestens einen fluoreszierenden Rest und einen Nukleinsäureanteil. Die Wechselwirkung mit den in vitro amplifizierten Nukleinsäuresequenzen in Abhängigkeit des Denaturierungszustandes geht einher mit einer Änderung des spektroskopischen Meßsignals. Dies kann beispielsweise durch Interkalation des Farbstoffes in die Nukleinsäuredoppelhelix oder durch Verdünnungs- oder Konzentrierungseffekte im Meßkompartiment erfolgen.

In einer weiteren bevorzugten Ausgestaltung des erfindungsgemäßen Verfahrens wird der durch den Gradienten ausgelöste Denaturierungsprozeß der Nukleinsäure über eine Änderung der Wellenlänge und/oder eine Fluoreszenzintensität-Shift und/oder eine Änderung der Lebenszeit eines angeregten Zustands oder über das Prinzip des sogenannten Energy Transfers (Förster Transfer) oder über einen Konzentrationseffekt erfaßt.

Das erfindungsgemäße Verfahren ermöglicht auch eine simultane oder sequenzielle Erfassung mehrerer verschiedener amplifizierter Nukleinsäuresequenzen. Dies erfolgt dadurch, daß mehrere spektroskopisch voneinander unterscheidbare Farbstoffe eingesetzt werden, mit denen sich die verschiedenen amplifizierten Nukleinsäuren

analysieren lassen und/oder über die mindestens eine unabhängige Eichsubstanz eingeführt wird. Dies ist insbesondere dann möglich, wenn die verschiedenen Nukleinsäuren, die analysiert werden sollen mit unterschiedlich markierten Hybridisierungspartnern in Wechselwirkung treten.

Die Aufnahme des Meßsignals erfolgt beispielsweise durch Messung der von den Farbstoffen ausgehenden Fluoreszenz, welche insbesondere durch einen Laser kontinuierlich oder getaktet angeregt werden können.

Eine weitere bevorzugte Ausgestaltung des erfindungsgemäßen Verfahrens beruht darauf, daß die amplifizierten Nukleinsäuren mindestens einen koamplifizierten Nukleinsäurestandard enthalten, dessen Sequenz zu einer zu bestimmenden Sequenz homolog ist, vorzugsweise identisch ist, mit Ausnahme jedoch einer Punktmutation, die insbesondere in einem Sequenzbereich niedrigster Stabilität liegt. Es ist jedoch darauf zu achten, daß diese Punktmutation außerhalb der Primer-Bindungsstellen liegt, wenn enzymatische Amplifikationen durchgeführt werden. Der Nukleinsäurestandard kann ebenfalls ein natürlicher Bestandteil der zu analysierenden Nukleinsäure sein.

Das erfindungsgemäße Verfahren erlaubt die Durchführung der Amplifikation in homogener Phase oder mit einem an eine feste Phase gekoppelten Primer, an dessen verlängerter Sequenz die markierte Sonde hybridisieren kann. Die Konzentration der Sonde kann somit entweder gezielt auf dem Festphasenträger oder in der freien Lösung bestimmt werden. Vorzugsweise wird mindestens ein Fluoreszenzfarbstoffmolekül an ein Nukleinsäuremolekül gekoppelt, dessen Sequenz identisch oder homolog mit der nachzuweisenden Nukleinsäure oder dem koamplifizierten Nukleinsäurestandard ist.



Wenn das Nukleinsäuremolekül mit dem daran gekoppelten Fluoreszenzfarbstoff dem Reaktionsgemisch nach erfolgter Amplifikation zugesetzt wird, erfolgt die Hybridisierung mit den amplifizierten Nukleinsäuren, vorzugsweise durch einen thermischen Denaturierungsschritt mit nachfolgendem Renaturierungsschritt. Es ist erfindungsgemäß jedoch auch möglich, daß das Nukleinsäuremolekül mit gekoppeltem Fluoreszenzfarbstoff dem Reaktionsgemisch vor erfolgter Amplifikation zugesetzt wird. Dabei ist die Sonde als nicht amplifizierbare Doppelstrang-RNA oder als nicht amplifizierbare chemisch modifizierte Nukleinsäure zuzusetzen.

Zur Amplifikation der Nukleinsäure wird vorzugsweise ein Primer des zur Amplifikation eingesetzten Primerpaares verwendet, welcher 5'-terminal eine G:C-reiche Region enthält von beispielsweise 15 bis 20 G:C-Resten.

Zur Durchführung des Verfahrens werden vorzugsweise Foliensysteme mit Vertiefungen oder Ausbuchtungen als Reaktionsräume verwendet. Die Foliensysteme sind insbesondere thermisch verschweißbar und als Aufnahme für verwendungsfertige Reagenziengemische in gefriergetrockneter oder matrixgebundener Form einsetzbar. Weiterhin gewährleisten sie direkte optische Vermessung, sind also zumindest für bestimmte Wellenlängenbereiche transparent. Die zur Durchführung des erfindungsgemäßen Verfahrens benötigten Reagenzien werden vorzugsweise in räumlich abgetrennten Matrices gelagert und nach dem Schließen eines Reaktionsraumes zeitlich getrennt dem Reaktionsgeschehen zugeführt. Vorzugsweise sind die Reaktionsräume im Abstand der Löcher handelsüblicher Mikrotiterplatten voneinander getrennt. Dies hat insbesondere den Vorteil, daß Geräte, die zur Bearbeitung von Mikrotiterplatten geeignet sind, in der erfindungsgemäß beschriebenen Technologie eingesetzt werden können.

Zur Analyse eines amplifizierten Nukleinsäuregemisches wird nach Zugabe der zur Reaktion benötigten Substanzen ein zeitlich gesteuerter Temperaturgradient angelegt und das Denaturierungsverhalten der Nukleinsäuren gemessen. Dies erfolgt durch die Änderung der spektroskopischen Parameter der mit der Nukleinsäuresequenz in Wechselwirkung tretenden Substanz. Die Änderung des spektroskopischen Parameters wird zeitlich oder in äquivalenter Weise, in Abhängigkeit der Temperaturänderung verfolgt.

Die Auswertung der Funktion der Änderung des spektroskopischen Verhaltens der mit der Nukleinsäure in Wechselwirkung tretenden Substanz erlaubt dann den Schluß auf Anwesenheit oder Anzahl oder Homologie einer gesuchten Nukleinsäure zum korrespondierenden Standard. Die Auswertung der Daten erfolgt vorzugsweise on line durch eine Datenverarbeitungsanlage.

Vorteilhaft am erfindungsgemäßen Verfahren äußert sich neben dem Abstellen der oben genannten Nachteile des Standes der Technik, daß die Amplifizierung der Nukleinsäuren und die spätere Analytik in einem einzigen hermetisch verschlossenen Reaktionskompartiment durchgeführt werden kann, so daß eine Entsorgung dieser biologischen Stoffe ohne Öffnung der Kompartimente möglich ist, wodurch eine potentielle Kontaminationsquelle ausgeschaltet wird. Desweiteren ermöglicht diese Vorgehensweise die Lagerung von Testfolien der oben genannten Art im geschlossenen Zustand auch über längere Zeiträume, so daß eine Archivierung der oftmals wertvollen Testsubstanzen möglich wird. Die Lagerung erfolgt aber vorzugsweise im gefrorenen Zustand. Das erfindungsgemäße Verfahren ermöglicht ebenfalls in vorteilhafter Weise, daß die Versuche gegebenenfalls zu einem späteren Zeitpunkt auch nach längerer Zwischenlagerung wiederholbar

sind, oder das amplifizierte Gemisch danach präparativ aufarbeitbar und analysierbar ist.

Die Vorrichtung zur Durchführung des erfindungsgemäßen Verfahrens weist eine Einrichtung zur zeitabhängigen Thermostatisierung der im Verfahren zu verwendenden Reaktionsräume auf. Vorzugsweise wird die Thermostatisierung durch eine programmierbare Einheit gesteuert. Die Ableseeinrichtung der erfindungsgemäßen Vorrichtung besteht vorzugsweise aus einer optischen Einheit, die in der Lage ist, Photonen zu registrieren. Besonders bevorzugt sind solche Einheiten, die zur Registrierung emittierten Fluoreszenzlichts geeignet sind. Ebenfalls in Betracht kommen Geräte, die in der Lage sind, andere spektroskopische Eigenschaften, wie Kernspinn oder Elektronenspin etc., die mit der Änderung, Konformation der Doppelhelix korrelierbar sind, einzusetzen.

Die Vorrichtung zur Durchführung des erfindungsgemäßen Verfahrens ist in der Lage, ein Mittel zur Durchführung des Verfahrens aufzunehmen, das aus einem System von Reaktionskompartimenten, vorzugsweise aus einem Folien-system mit gebrauchsfertigen Reagenzien in gefriergetrockneter Form aufweist. Die Reaktionskompartimente sind vorzugsweise im Mikrotiterformat angeordnet. Die Reagenzien des Mittels zur Durchführung des Verfahrens sind vorzugsweise in mindestens einer wasserlöslichen Matrix fixiert und/oder gelagert. Die Matrix enthält vorzugsweise Stabilisatoren, wie Zucker, insbesondere Trehalose oder Saccharose. Bevorzugt enthält das Mittel zur Durchführung des erfindungsgemäßen Verfahrens Reaktionskompartimente und/oder weitere Reagenzienreservoirs, Amplifikationsprimer, Pufferbestandteile sowie mindestens eine Polymerase und übliche Kofaktoren zur Durchführung der Amplifikationsreaktion. In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform des Mittels zur Durchführung des er-

findungsgemäßen Verfahrens ist der Reaktionsraum bzw. das Reaktionskompartiment mit einem weiteren abgetrennten Reagenzienreservoir in einer Matrix versehen, die sich in der das Kompartiment verschließenden Folie befindet. Dabei wird vorzugsweise die markierte Sonde mit den für die Hybridisierung notwendigen Puffersubstanzen gelagert.

Das Mittel zur Durchführung des erfindungsgemäßen Verfahrens ist vorzugsweise in Kit-Systemen zusammengestellt, das Reaktionsgefäße, wie Foliensysteme mit lagerfähigen und direkt einsetzbaren Reagenziengemischen, wobei die Reaktionsgefäße nur mit der zu analysierenden Probe beschickt werden müssen, um dann im hermetisch versiegelten Zustand einem Amplifikationsverfahren und anschließender Analyse unterworfen zu werden.

Das erfindungsgemäße Verfahren eignet sich insbesondere zur Analyse von Stoffgemischen, vorzugsweise Nukleinsäuren, in denen mindestens eine Komponente im Temperaturbereich des zeitlichen Temperaturgradienten eine thermische Umwandlung erfährt. Durch Hinzufügen und Kopplifikation eines Standards mit genau bekannter Kopienzahl ist das erfindungsgemäße Verfahren standardisierbar und erlaubt quantitative Aussagen über die amplifizierte Nukleinsäuren der zu untersuchenden Probe. Mit dem erfindungsgemäßen Verfahren lassen sich Punktmutationen, Deletionen, Insertionen und Umstellungen in der DNA/RNA-Nukleinsäuresequenz feststellen. Mit der quantitativen Analyse läßt sich auch die Konzentration dieser Änderungen in der Nukleinsäuresequenz ermitteln. Die Proben können aus unterschiedlichstem Material stammen, wie lebendem, totem, fossilem und in vivo nicht mehr stoffwechselaktivem Gewebe oder aus Körperflüssigkeiten, aus in vitro Zellkulturen oder aus Proben der Umwelt. Das erfindungsgemäße Verfahren ermöglicht qualitative und quantitative Erfassung zellulärer Gene und Gene infektiöser Krankheits-

erreger direkt oder über ihre RNA-Genprodukte als Wildtypsequenz oder als Varianten.

Das erfindungsgemäße Verfahren läßt sich aber auch zur Untersuchung und Bestimmung von potentiell toxischen Substanzen oder potentiell pharmazeutischen Wirkstoffen oder chemischen oder biologischen Pflanzenschutzmitteln einsetzen, indem deren Einfluß auf Nukleinsäuresequenzen oder deren Amplifikation untersucht werden.

#### Figur 1

Die Figur 1 beschreibt schematisch den bevorzugten erfindungsgemäßen Ablauf der TESGA Methodik. In einer Vorlage von Reaktionskompartimenten in Format einer Mikrotiterplatte befinden sich alle für eine spezifische Amplifikation einer Nukleinsäure notwendigen Reagenzien in lyophilisierter Form mit Ausnahme der zu analysierenden Probe im wäßrigen Reaktionsmedium. Dieses wird vor der Amplifikationsreaktion zugesetzt und eine homogene Lösung hergestellt. Danach werden die Reaktionskompartimente mit einer zweiten Folie verschlossen, wobei die zweite Folie mindestens eine weitere Matrix enthält mit Reagenzien, die nicht an der eigentlichen Amplifikationsreaktion teilnehmen sollen. Die Folie wird in einem Thermostatierblock positioniert, um die enzymatische Amplifikationsreaktion durchzuführen. Hierbei können sowohl Amplifikationen bei homogener Temperatur als auch in zyklisch variierenden Temperaturabläufen (PCR) ausgeführt werden. Nach erfolgter Amplifikation wird das Reaktionsgemisch mit dem zweiten Reagenzienreservoir in Kontakt gebracht und eine homogene Lösung hergestellt. Nach Durchführen eines Denaturierungs-/Renaturierungsprozesses registriert ein optisches Detektionssystem die laserangeregte Lumineszenz (Fluoreszenz, Phosphoreszenz) in Abhängigkeit eines linearen Temperaturgradienten, der über den Thermo-

block zeitlich gesteuert wird. Der steigende Temperaturgradient kann in einem weiten Bereich variiert werden. Die Anfangstemperatur kann minimal 5°C, die Endtemperatur maximal 100 °C betragen.

## Figur 2

Die schematische Darstellung symbolisiert den molekularen Verlauf des erfindungsgemäßen Verfahrens am Beispiel interkalierender Farbstoffe, die nicht an eine Nukleinsäuresonde fixiert sind (z.B. Ethidiumbromid). Diese Farbstoffmoleküle lagern sich unter nativen Bedingungen zwischen benachbarte Basenpaare in doppelsträngiger DNA oder RNA ein. Im interkalierten Zustand erhöht sich die Fluoreszenzausbeute bis zum 20-fachen und die Lebensdauer des angeregten Zustandes etwa um das 10-fache. Wird dieses System einem thermischen Gradienten unterworfen, so beginnen zunächst die instabilsten Helixbereiche zu denaturieren. Eine Fehlpaarung, wie sie bei der Heteroduplexbildung erzeugt wird, destabilisiert den entsprechenden Sequenzbereich und führt zu dessen frühzeitiger Öffnung. Die in diesem Bereich zunächst gebundenen Farbstoffmoleküle werden freigesetzt, wodurch eine Erniedrigung des Gesamtfluoreszenzsignals bedingt wird. Dabei ist die Farbstoffkonzentration so zu wählen, daß freier Farbstoff und gebundener Farbstoff im thermodynamischen Gleichgewicht stehen und der freie Farbstoff in deutlichem Überschuß vorliegt. Erst bei höheren Temperaturen öffnet sich der entsprechende Sequenzbereich des Homoduplex, wodurch eine weitere stufenweise Erniedrigung des Fluoreszenzsignals erfolgt. Aus dem Verhältnis der Intensitäten beider Stufen lassen sich die relativen Mengenverhältnisse von Homoduplex und Heteroduplex ermitteln.

Figur 3a und 3b

Die Figur 3a zeigt die bevorzugte Konstruktion des TESGA-Standards bzw. der fluoreszenzmarkierten Sonde in einer bevorzugten Ausführungsform. Der Standard soll sich in mindestens einer Basenposition von der nachzuweisenden Nukleinsäure unterscheiden. Diese Mutation befindet sich in dem Sequenzbereich niedrigster thermodynamischer Stabilität und kann leicht unter Verwendung eines Primers P3 eingeführt werden. Die Mutation soll sich jedoch außerhalb der Primer-Bindungsstellen von P1 und P2 befinden. Ein Primer (P2) kann 5'-terminal eine GC-reiche Region enthalten, während der andere Primer (P1) vorzugsweise mit einem Fluoreszenzfarbstoff über einen Spacer chemisch gekoppelt ist, wobei der Fluoreszenzfarbstoff in einem doppelhelikalen Bereich interkalieren kann. Das Anwendungsprinzip der fluoreszenzmarkierten TESGA-Sonde ist in Figur 3b schematisiert dargestellt.

Figur 4

Eine bevorzugte Ausführungsform eines TESGA-tauglichen Primers ist bereits für andere Anwendungen beschrieben (Thuong, N.T. & Chassignol, M. (1987) Tetrahedron Letters 28, 4157-4160; Thuong, N.T. et al. (1987) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 84, 5129-5133; Helene, C. in DNA-Ligand Interactions (1987) Plenum Publishing Corporation, 127-140, W. Guschelbauer & W. Saenger Ed.). Sie sind bereits teilweise kommerziell erhältlich (Appligene, Straßburg, Frankreich). Er enthält einen Spacer-gekoppelten Fluoreszenzfarbstoff, der interkalationsfähig ist, wenn sich der Primer in einem doppelhelikalen Bereich befindet. Wird die Doppelhelix thermisch denaturiert, so ändern sich die Fluoreszenzeigenschaften des Farbstoffes.

Figur 5

Die Figuren 5a - 5e zeigen schematisch mögliche experimentellen Resultate, die mit der TESGA-Technik erhalten werden können. Die zwei gestrichelten Linien markieren die Position des Standard Homoduplex (2) sowie die Position des aus markierter Sonde und zu erwartender Wildtyp-Sequenz (1) bestehenden Heteroduplex 1. Trägt die zu analysierende Sequenz mindestens eine weitere Mutation, so ergibt sich ein stufenweiser Fluoreszenzabfall bereits bei tieferer Temperatur, die für die Mutation charakteristisch ist (B3). Die relative Höhe der Stufen zueinander ( $1/2$ ,  $3/4$ ,  $6/7/8$ ) gibt direkt das Verhältnis der relativen Konzentration der beteiligten Moleküle wieder. Ein Ergebnis gemäß Abbildung C wird erhalten, wenn lediglich die Standard-Nukleinsäure amplifiziert wird und die biologische Probe keine oder nur geringe Mengen der entsprechenden Nukleinsäure enthält. Ein Ergebnis gemäß D6 wird erhalten, wenn die Amplifikationsreaktion nicht ordnungsgemäß abgelaufen ist und nicht einmal der Standard amplifiziert worden ist. Enthält die biologische Probe mehr als eine homologe Nukleinsäurespezies so ergeben sich mehrere voneinander unterschiedliche Stufen des temperaturabhängigen Fluoreszenzverlaufes (6 und 7).

Figur 6

Die Figur 6 beschreibt den schematischen Temperaturverlauf und die zugehörigen Einzelschritte bei der TESGA Analytik. Im oberen Beispiel ist der Ablauf der Analyse mit der PCR Technik dargestellt, im unteren Beispiel der Verlauf bei einer Amplifikation bei homogener Temperatur ( $37^{\circ}\text{C}$ ).

- 1) Zusatz der biologischen Probe zum lyophilisierten Amplifikationsansatz und Verschweißen des Reaktionskompartimentes.



- 2) Amplifikation bei homogener Temperatur oder mit Temperaturprogrammen (PCR).
- 3) Zumischen der markierten Sonde(n) im Hybridisierungspuffer.
- 4) Denaturierungsschritt bei 98°C.
- 5) Sondenreassoziatio n mit der amplifizierten DNA.
- 6) Zeitlicher Temperaturgradient mit optischer On-Line-Kontrolle.

Figur 7

Die Figur 7 zeigt schematisch eine mögliche Ausführungsform der TESSA-Analytik für die automatisierte Analyse von Großserien. Zum Testkit gehören die Folienbestandteile mit den lagerfähigen und gebrauchsfertigen Reagenzien. Die Balkenkodierung erlaubt eine Definition des Assay-Typs sowie der Belegung der Positionen. Der beschreibbare Magnetstreifen steht dann den Proben-spezifischen Daten zur Verfügung. Die Testfolien können nach der Analyse ohne Öffnen entsorgt oder für eventuelle weitere Analysen archiviert werden.

Figur 8

Die schematische Darstellung erklärt eine spezielle Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens. Ein zur Amplifikation verwendeter Primer ist oberflächenfixiert, z.B. an magnetischen Partikeln (magneto beads). Magneto beads lassen sich zu Zwecken der Amplifikation und Hybridisierung mit Hilfe eines Magnetfeldes in Form einer Suspension halten, zum Zwecke der Laser-Fluoreszenz-Beobachtung während des Temperaturgradienten-induzierten Dissoziationsprozesses jedoch der Lösung entziehen und an einem definierten Ort fixieren. So läßt sich der Laserstrahl direkt auf die Partikeloberfläche richten und gezielt die Fluoreszenz beim Abdissoziieren der Sonde

verfolgen. Dieser Prozess gelingt z. B. bei Verwendung einer einzigen Schmelzdomäne und ermöglicht den Einsatz oligomerer, nicht-interkalierender Fluoreszenzfarbstoffe als optischen Marker.

Reaktion und Analyse können in einem einzigen Reaktionskompartiment durchgeführt werden. Vorzugsweise wird ein Mikrotiter-Format gewählt, das es erlaubt, simultan 96 Proben oder Anteile von 96 Proben (8er oder 16er Strips) einer Analytik zu unterziehen. Das Reaktionsgefäß ist so konstruiert, daß es vorzugsweise Volumina von 20 - 100  $\mu$ l trägt. Anstelle einzelner Reaktionsgefäße werden vorzugsweise Folien verwendet, die Vertiefungen oder Ausbuchtungen aufweisen, in denen die Proben aufgenommen werden. Ansich bekannte Folien, eignen sich für das erfindungsgemäße Verfahren insbesondere, da sie besonders effizient thermostatierbar sind, billig in der Herstellung und problemlos in der umweltverträglichen Entsorgung. Die Verwendung optisch klarer Folien für den Bereich des sichtbaren Lichtes erlaubt eine On-Line-Registrierung von Fluoreszenz-Signalen handelsüblicher Fluoreszenz-Farbstoffe.

Die Folien lassen sich mit den allgemein benötigten Reagenzien befüllen (Enzyme, Primer, Puffer, Stabilisatoren etc.) und im lyophilisierten Zustand über lange Zeiträume konservieren. Als Stabilisatoren werden vorzugsweise Trehalose oder Saccharose eingesetzt. Die seriell angeordneten Reaktionsgefäße lassen sich nach Hinzufügen der zu analysierenden Proben hermetisch verschließen. Dieses kann durch Verschmelzen einer Deckfolie mit der Reaktionskompartiment-tragenden Folie geschehen. Es lassen sich auch solche Folien verwerten, die mit einem thermoplastischen Polymer beschichtet sind und sich unterhalb der Schmelztemperatur der eigentlichen Trägerfolien verschweißen lassen. Im Deckelbereich der Trägerfolie ober-

halb der Reaktionskompartimente lassen sich Reagenzien fixieren oder kompartmentieren, die nicht von Anfang an am Reaktionsgeschehen teilnehmen sollen. Dies ist im erfindungsgemäßen Falle z. B. die spezifisch markierte Sonde, die in einem Puffergemisch lyophilisiert und stabilisiert wird, das nach erfolgter Amplifikationsreaktion für die Hybridisierung vom Amplifikationsprodukt und markierter Sonde benötigt wird. Nach Verschweißen der Reaktionskompartimente findet die Amplifikationsreaktion bei homogener Temperatur (3 SR, Self-sustained Sequence Replication; TAS, Transcription based amplification system) (J.C. Guatelli et al. (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. 87, 1874-1878; Kwoh, D.Y., Davis, G.R., Whitfield, K.M., Chapelle, H.L., Dimichele, L.J. & Gingeras, T.R. (1989) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86, 1173-1177) oder im Thermocycler als Polymerase-Kettenreaktion (PCR) statt. In diesem Schritt werden Standard und Template im konstanten Verhältnis amplifiziert, so daß das Reaktionsendprodukt ca. 100 ng bis 1 µg amplifizierte Nukleinsäure enthält.

In einer möglichen, technisch sehr einfachen Ausführungsform (Figur 2), befindet sich im Reaktionskompartiment ein gelöster Lumineszenz-, vorzugsweise ein Fluoreszenzfarbstoff, vorzugsweise mit interkalierenden Eigenschaften (siehe unten), der an mehreren Positionen in doppelhelikalen Strukturen bindet und im gebundenen Zustand veränderte spektroskopische Eigenschaften besitzt. Wenn bei der späteren Analyse im zeitlichen Temperaturgradienten die entsprechenden Doppelstrangstrukturen denaturiert werden, wird der Farbstoff wieder freigesetzt. Dieser Vorgang wird spektroskopisch registriert. Eine notwendige Bedingung für diese Verfahrensweise ist jedoch, die Konzentration des freien Farbstoffes so zu wählen, daß sie größer ist als die Anzahl der freien Bindungsplätze. Andererseits führt eine Freisetzung des Farbstoffes aus einer Doppelstrangregion zur Bindung in einer anderen Struktur, ohne Änderung des Fluoreszenzsignales.

In einer alternativen bevorzugten Ausführung wird die wässrige Lösung des Reaktionskompartimentes mit einer vorzugsweise an der Verschußfolie kompartimentiert gelagerten Fluoreszenzfarbstoff-markierten Sonde unter Lösen der Sonde in Kontakt gebracht (Figuren 3 und 4). Nach Denaturierung und Renaturierung wird die Sonde fluoreszenzspektroskopisch verfolgt. Bei tiefen Temperaturen befindet sich die Sonde im Doppelstrang-Hybrid mit amplifiziertem Standard (Homoduplex) und amplifiziertem Template (Heteroduplex). Nun wird das Reaktionskompartiment zeitlich, vorzugsweise linear aufgeheizt, wobei zunächst der Heteroduplex partiell oder vollständig denaturiert und anschließend der Homoduplex partiell oder vollständig denaturiert. Aus dem relativen Verhältnis der Denaturierungssignale, gemessen über die Stufen der Fluoreszenzabnahmen (Figuren 5a bis 5e), läßt sich exakt der Template-Titer kalkulieren.

Als Denaturierungssignal wird vorzugsweise ein Fluoreszenzmarker verwandt. Insbesondere eignen sich hierzu Fluoreszenzfarbstoffe, die die Eigenschaft besitzen, nur dann stark zu fluoreszieren, wenn sie zwischen die Basenpaare eingelagert werden (Interkalkation). Wenn solche Farbstoffe aus einer Doppelhelix infolge eines Denaturierungsprozesses freigesetzt werden, so läßt sich das an einer Veränderung der Fluoreszenzintensität registrieren (Fluoreszenzabfall). Haben Doppelhelices unterschiedliche Stabilität wie im Falle von Homoduplex und Heteroduplex, dann finden diese Signaländerungen bei unterschiedlichen Temperaturen statt und lassen sich getrennt analysieren und auswerten. Die exakte Denaturierungstemperatur reflektiert darüberhinaus mögliche Sequenzunterschiede, wie sie bei Virusdrifts infolge Mutation auftreten können.

Interkalierende Farbstoffe besitzen gelegentlich eine weitere günstige Eigenschaft, die sich auf die Halbwertszeit des angeregten Zustandes bezieht. Im Falle von Ethidiumbromid ist die Lebensdauer des Anregungszustandes mehr als 10 x länger, wenn sich das Fluoreszenzmolekül im interkalierten Zustand befindet. Dadurch läßt sich eine getaktete Laseranregung verwenden, wobei die Fluoreszenzintensität in der nachfolgenden Phase der Fluoreszenz-emission ohne Streulicht-Einflüsse des Anregungslichtes gemessen werden können. Es ist mit dem erfindungsgemäßen Verfahren möglich, Farbstoffe wie Ethidiumbromid vorzugsweise in niedriger Konzentration (vorzugsweise  $10^{-10}$  -  $10^{-7}$  M) zu verwenden.

Außer der direkten Messung einer Fluoreszenzintensität läßt sich auch erfindungsgemäß ein sogenannter Förster-Transfer (Energy-Transfer) zwischen eng benachbarten Fluorophoren oder der Parameter der Fluoreszenzpolarisierung verwenden.

Eine hohe Spezifität wird erfindungsgemäß erzielt, wenn eine Sonde verwendet werden kann, die kovalent mit einem oder mehreren Farbstoffmolekülen verknüpft ist (Figur 4). Dies wird vorzugsweise dadurch erreicht, daß ein Primer zur Herstellung der Sonde verwendet wird, der endständig oder intern mindestens ein Farbstoffmolekül trägt. Nur wenn sich die Sonde im basengepaarten Zustand des Homoduplex oder Heteroduplex befindet, erhält man eine maximale Fluoreszenzintensität des Doppelstrang-interkalierten Fluoreszenzfarbstoffes. Die Fluoreszenzintensität der parallel geführten Reaktionsansätze kann simultan mit Hilfe einer Kamera erfaßt werden. Die Einzelauswertung der Kanäle ergibt einen Fluoreszenzverlauf, wie er typisch in Figur 5 dargestellt ist. Die relative Höhe der Fluoreszenzänderungen kann über einen On-Line angeschlossenen Computer direkt in Kopienzahlen umgerechnet werden.

In einer weiteren spezifischen Ausführungsform der erfindungsgemäßen Analyse wird die Reaktion innerhalb des Kompartimentes teilweise Festphasenträger-gekoppelt durchgeführt (Figur 8). Der Vorteil dieser Vorgehensweise liegt darin begründet, daß sich mit Hilfe einer Laser-Optik gezielt die Oberfläche eines Festphasenträgers, oder alternativ die Lösung ohne den Festphasenträger vermessen läßt. Das bedeutet für die praktische Durchführung, daß ein Fluoreszenzfarbstoff Verwendung finden kann, der nicht notwendigerweise seine meßbaren Parameter über Interkalation verändert. Somit können Sonden mit beliebigen, oligomeren Farbstoffen verwendet werden, mit denen eine mehr als zehnfache Steigerung der Fluoreszenzintensität erreicht werden kann. Der thermisch induzierte Denaturierungsprozess (siehe oben) kann dann verfolgt werden, indem die Dissoziation der Sonde von oberflächen-gebundenen, amplifizierten Nukleinsäuren (Probe und Standard) in die freie Lösung über die Abnahme der Fluoreszenz gemessen wird (Verdünnungseffekt). Dieses Vorgehen ist auf solche Analysen beschränkt, bei denen die zur Standardisierung herangezogene Doppelstrangregion in der thermodynamisch stabilsten Schmelzregion liegt, oder, bei Sonden, die nur eine Schmelzregion aufweisen.

Auf einen Zusatz einer markierten Sonde nach erfolgter Amplifikation kann verzichtet werden, wenn die Sonde aufgrund bestimmter Eigenschaften und Prozessführung der Amplifikation nicht am Amplifikationsgeschehen teilnehmen kann. Das kann erfindungsgemäß erreicht werden, wenn die Sonde in einer thermodynamisch stabilen Doppelstrangstruktur vorliegt, die während des Amplifikationsprozesses stabil bleibt und nicht am Reaktionsgeschehen teilhat. Es lassen sich z.B. markierte RNA-Doppelhelices hoher thermodynamischer Stabilität oder chemisch modifizierte Sonden einsetzen. Auf diese Weise läßt sich der Amplifikationsprozess so steuern, daß die Sonde bei der Amplifikations-

reaktion immer doppelsträngig bleibt und am Amplifikationsgeschehen nicht teilhat, sei es, daß die Denaturierungstemperatur nicht ausreichend ist oder die beteiligten Enzyme doppelsträngige RNA oder die modifizierte Sonde nicht amplifizieren.

Amplifikationstechniken bergen die große Gefahr in sich, daß nach erfolgter Amplifikation, amplifizierte DNA- oder RNA-Moleküle in die Umgebung austreten. Besondere Gefahr ist immer durch Aerosolbildung gegeben, die technisch nur äußerst schwer zu beherrschen ist. Die TESGA-Technik erlaubt es jedoch in ihrer besonderen Ausführung, Amplifikationsreaktionen und Analytik am hermetisch geschlossenen Reaktionsgefäß durchzuführen und dieses anschließend im geschlossenen Zustand zu entsorgen. Damit wird ein ganz entscheidender Beitrag zur molekularen Laborhygiene und für die Sicherheit der Ergebnisse einer Routinediagnostik geleistet.

Eine Routinediagnostik ist unmittelbar mit der Notwendigkeit einer Archivierung der Ergebnisse und - nach Möglichkeit - der analysierten Proben verbunden. Die erfindungsgemäße TESGA Technik bietet hier wiederum eine nahezu ideale Möglichkeit:

- Die Folien lassen sich mit Test-spezifischer Strichmarkierung ausstatten und somit bezüglich Zieltest, Herstelldatum, Verfallsdatum etc. charakterisieren und datenmäßig erfassen.
- Die Folien lassen sich im hermetisch verschlossenen Zustand über lange Zeiträume archiviert lagern.
- Analysen lassen sich zu späteren Zeitpunkten auf dem TESGA-Gerät wiederholen und verifizieren.

- Liefert die TESGA-Analyse Indizien für das Vorliegen neuer interessanter DNA/RNA-Varianten, läßt sich das Probengemisch entnehmen und direkt auf dem flächigen TGGE-Trennsystem präparativ auftrennen und z.B. einer Sequenzanalyse unterziehen.

Die Temperaturgradienten-Gelelektrophorese hatte für kleinere Serien ihre Zuverlässigkeit für eine quantitative Amplifikationsanalytik gezeigt. Bei dieser Technik werden vorzugsweise solche PCR-Amplifikate verwendet, die G:C-reiche, primer-kodierte Sequenzen am stabileren Fragmentende tragen. Diese sogenannten G:C-Klammern garantieren den für eine TGGE-Analyse notwendigen reversiblen Schmelzverlauf und unterdrücken eine vorschnelle Dissoziation der Fragmente in die Einzelstränge. Für eine Vielzahl von TESGA-Analysen werden G:C-Klammern, die kostspielig im Einsatz sind und bei der Amplifikation Schwierigkeiten verursachen können, nicht mehr erforderlich sein. Die sequentielle Freisetzung der Fluoreszenzfarbstoffe in einem Assay kann durchaus irreversibel erfolgen, ohne daß das Ergebnis verfälscht wird.

Die TESGA-Technik hat beträchtliche wirtschaftliche Bedeutung, die sowohl im Bereich der Testkit-Herstellkosten beruhen als auch in den Durchführungskosten der Analytik. Die Durchführung ist fast vollständig von Automaten zu erledigen, die das experimentelle Ergebnis in Form eines Hard-Copy-Berichtes ausdrucken können. Damit ist die TESGA-Technik nicht nur auf den Einsatz für kostspielige, quantifizierende Analysen großer Wertschöpfung beschränkt, sondern auch einsetzbar für preiswerte Analysen. Das betrifft z.B. den Bereich der Mikrobiologie, Humangenetik, Phytoanalytik, forensische Analytik und die industrielle Forschung wie z.B. die Wirkstoffforschung, das heißt Reihenuntersuchungen von Zielsubstanzen auf Wirkstoffe, die über DNA- oder RNA-Amplifikation oder -Modifikation be-



wertet werden können bis hin zu einfachen Toxizitätstests.

#### Einsatz- und Marktmöglichkeiten der TESGA-Technik

Das TESGA-System mit seinen spezifischen Eigenschaften

- PCR/3SR/TAS-Amplifikationseffizienz
- Eignung für Reihen- und Einzeluntersuchungen
- On-Line-Registrierung
- simultane Nukleinsäuren - Qualifizierung/Quantifizierung
- Eintopf-Mehrkomponenten Analyse
- Wegfall der Kontaminationsgefahr durch Amplifikate
- Niedrigkosten der Testreagenzien und Testdurchführung
- allgemein gültige - keine Test-spezifischen - Verfahrensprotokolle

erlaubt neue Einsatzmöglichkeiten der Amplifikations-techniken wie PCR, 3SR oder TAS.

In der genetischen Analytik ist auf längere Sicht ein Screening-Programm angestrebt, mit dem es beispielsweise möglich ist, aus Spuren von Biopsie-Material oder Fruchtwasserproben schwere genetische Erkrankungen nachzuweisen. Die Kostenbelastung für großflächige Programme ist hierbei ebenso eine entscheidende Restriktion wie die Tatsache, daß nur in den seltensten Fällen eine Analyse eines einzigen Genlocus ausreichend ist, Aussagen über das Überträgerpotential zuzulassen. Für die häufigste lethale Erberkrankung in der kaukasischen Bevölkerung, der Cystischen Fibrose, sind neben der zunächst gefundenen Mutation (Delta 508) mehr als 18 weitere

Mutationen beschrieben worden, die die Mukoviscidose auslösen können. TESGA erlaubt bei niedrigem zusätzlichem Kostenaufwand, eine große Anzahl von loci parallel zu analysieren und bei Bedarf - ohne großen Zusatzaufwand - weitere Testpositionen hinzuzunehmen. TESGA erlaubt beispielsweise auch die Untersuchung von Punktmutationen, die für bestimmte genetische Erkrankungen verantwortlich sind. Solche Erkrankungen können bislang nur mit der sehr schwer handhabbaren Allel-spezifischen Oligonukleotid-Hybridisierungstechnik (ASO) diagnostiziert werden.

Ähnlich bedeutungsvoll ist die Technologie für Thalassämie Screenings.

Damit wird deutlich, daß TESGA auch die bisherigen Suchmethoden nach definierten Mutationen vereinfachen und erheblich kostengünstiger gestalten kann. Anstelle einer künstlich eingeführten Mutation, kann zur Normierung oder Standardisierung die gesuchte, natürlich auftretende Mutante eingesetzt werden, bzw. als Sonde verwandt werden. Somit kommen alle diejenigen Assays in Betracht, die z.B. mit differentiellen Oligonukleotid-Hybridisierungen als Filterassays durchgeführt werden.

Epidemiologische Studien bei Infektions- und Erberkrankungen werden für die internationale Medizin zu einem immer wichtigeren Aufgabengebiet. Erinnt sei an die beängstigende Ausbreitungsgeschwindigkeit moderner viraler Erkrankungen wie AIDS (HIV), bedingt durch die veränderten soziobiologischen Strukturen. Eine entscheidende Voraussetzung für Vaccinierungs- und Therapieansätze ist eine möglichst umfassende und sorgfältige epidemiologische Erfassung des Ist-Zustandes mit epidemiologisch-prognostischer Bedeutung. Dies betrifft nicht nur das Auftreten des Virus selbst, sondern auch die geografische

Verteilung seines Variantenspektrums mit einer datenmäßigen Erfassung der Krankheitssymptomatik. Solche Studien werden erst durch eine aussagefähige automatisierte Analytik wirtschaftlich vertretbar.

Die Pharmaforschung stößt seit geraumer Zeit an die Grenzen der Machbarkeit auf ihren angestammten Aktivitätsfeldern. Es gibt viele Versuche, den offensichtlichen Beschränkungen herkömmlicher Pharmaforschung durch neue Konzeptionen zu begegnen. Angeführt sei das Beispiel des strategisch-intelligenten Wirkstoffdesign, das es erlauben soll, auf der Basis fundierten Wissens über eine Zielstruktur wie der eines Rezeptors, Effektormoleküle mit vorberechneter Struktur gezielt zu synthetisieren und somit herkömmliche Screening Methoden zu ersetzen. Eine zweite zukunftssträchtige Strategie ist die evolutive Biotechnologie mit ihrem Potential, unter Ausnutzung evolutiver Systeme Stoffe mit erwünschtem Wirkpotential zu generieren. In der Pharmaforschung der Zukunft müssen aus Kostengründen als auch projektbedingt personalintensive, randomisierte Syntheseprogramme vermieden werden.

Das erfindungsgemäße Verfahren TESGA kann hierbei einen wichtigen Beitrag leisten. Die Tauglichkeit für Reihenuntersuchungen mit quantifizierenden DNA/RNA-Tests bei niedrigen Kosten erlaubt es, neue Tests für automatisiertes Aufspüren von Wirkstoffen in der Onkologie, bei viralen und bakteriellen Infektionen sowie Tests für toxikologische Studien aufzubauen. Es werden neue Assay-Systeme in Kombination mit zellulären in vitro-Systemen denkbar, die mehr und mehr Tiermodelle ersetzen werden. Dabei darf auch nicht vergessen werden, daß Kultivierungs- und Testzeiten erheblich verkürzt werden, da z. B. Variationen auf dem mRNA-Level unmittelbar erfaßt werden, ohne daß langwierig zelluläre Folgereaktionen

gemessen werden müssen. Für eine Reihe von Assays könnte es möglich werden, transformierte Zellkulturen durch Primärkulturen z. B. aus Blut zu ersetzen. Die gleichzeitige hohe Sensitivität würde es auch erlauben, Differenzierungsparameter zu registrieren, um Zelltypspezifische Wirkungen zu messen. Gedacht ist z.B. an bestimmte Leukozyten-Subpopulationen (Makrophagen, T4-Zellen etc.) mit ihren charakteristischen Rezeptorfunktionen und Infizierbarkeiten mit Viren wie HIV.

Biologische Experimente mit rekombinanten Systemen, insbesondere Freisetzungsexperimente verlangen sowohl von wissenschaftlicher Seite als auch von seiten des Umweltschutzes nach einer sorgfältigen Analytik von Genen, der Erfassung der Genpersistenz in Populationen, Genveränderungen und Genaktivitäten. Als Beispiel seien antivirale Therapien bei Pflanzen genannt, bei denen versucht wird, Virusresistenz gegen bestimmte Viren dadurch zu erzeugen, daß transgene Pflanzen konstruiert werden, die virale Hüllproteine erzeugen und so die Pflanzen vor Befall mit einem Fremdvirus schützen. Ein Freisetzungsexperiment oder ein Einkreuzen in natürlich vorkommende Populationen setzt ein genaues Wissen voraus, zum Beispiel:

- Wie ist das Segregationsverhalten der rekombinanten Pflanzen bezüglich des rekombinanten Locus?
- Wie aktiv sind die Hüllprotein-Gene bezogen auf die Population und die Generationszahl?
- Wie reagiert der virale Zielorganismus auf den neuen Selektionsstreß?

Das erfindungsgemäße Verfahren TESSA ermöglicht hier Reihenuntersuchungen und insbesondere die Erfassung von Probenkollektiven in einem einzigen Test, um quantitative Aussagen über Populationen zu erhalten. Gleichzeitig werden Drift-Phänomene bei Resistenzbildung verfolgbar.

Mikrobiologische Tests der Bakteriologie werden traditionsgemäß durch Kultivierung oder direkte Dot-Hybridisierung durchgeführt. Solche Tests waren bislang durch aussagefähigere Tests kaum zu verdrängen, allein bedingt durch den Kostenaspekt. Das erfindungsgemäße Verfahren TESGA kann diese Situation vollständig verändern. Es stellt bei TESGA auch keinen entscheidenden Kostenfaktor dar, wenn eine Probe simultan auf mehrere Erreger gleichzeitig getestet werden muß oder wenn ein Erreger in einem Antibiotogramm analysiert werden muß.

Der letztgenannte Analyisentyp kann insbesondere bei virologischen Analysen eine große Rolle spielen, wenn Virusresistenzen ausgetestet werden müssen bzw. quantifizierend erfaßt werden müssen. Für die Virologie könnte es entscheidend werden, daß TESGA eine stark simplifizierte Analytik durch eine äußerst kostengünstige und zeitreduzierte Kopplung von Anzucht- und Testverfahren einer Viruspropagation erlaubt.

In der Nahrungsmittelindustrie geht es in erster Linie um große Testserien auf wenige mikrobiologische Erregerklassen, jedoch ausgehend von einer Vielzahl von Probenmaterialien der Ausgangsprodukte, der Verfahrensschritte, des apparativen Containments und der Endprodukte. Ähnlich wie in der Pharmaindustrie werden bei der Verarbeitung Großansätze von erheblichem ökonomischen Wert bearbeitet. Der Zeitfaktor verbunden mit einer zuverlässigen Testaussage stellt hierbei einen kritischen Faktor dar. Es sei daran erinnert, daß Salmonellentests häufig nach wie vor über langwierige Anzuchtverfahren verlaufen. TESGA könnte mit seinen auch quantifizierbaren Analysen in Reihenuntersuchungen einen Verzicht auf Anzuchtverfahren bewirken und kostspielige Prozessführungsschritte und Lagerungen einsparen.

Phytopathologische Analysen stehen unter einem oft prohibitiven Preisdruck des Einzeltests. Selbst wenn in der Regel nur repräsentative Probenkollektive von Saatgut oder Zier- und Nutzpflanzen der Analyse auf beispielsweise Virusbefall zugeführt werden, so ließ die Anzahl der Proben aus Kostengründen bislang fast ausschließlich immunologische ELISA-Verfahren zu, die häufig nicht oder nur unzureichend funktionieren. Die Phytoanalytik bedarf jedoch bereits in naher Zukunft anderer Analysenkonzepte, um dem Bedarf gerecht zu werden.

Nachdem nun erstmals RNA-Parameter gefunden worden sind, die eine exakte Wald-Schadensanalyse zulassen (Riesner et al., in Vorbereitung), läßt sich mit TESGA ein großes eventuell internationales Programm zur Schadenserfassung und der zeitlichen und geographischen Ausbreitung von Waldschäden konzipieren.

Die Molekularbiologische Forschung bemüht sich in steigendem Maße um Analysenverfahren, die Serientauglichkeit haben. Das am meisten diskutierte Projekt ist sicherlich das HUGO-Projekt zur vollständigen Sequenzaufklärung des humanen Genoms sowie der Genome anderer wichtiger Organismen. In der Zukunft wird es bei diesem Projekt nicht nur darum gehen, ein singuläres Genom vollständig zu analysieren, sondern auch bestimmte Loci mit krankheitsbezogenem Potential zu analysieren, wie es vergleichbar beim Identitätstesten notwendig ist (HLA-Analytik, Haplotyp-Assoziation, genetische Variabilität etc.).

Das erfindungsgemäße Verfahren ermöglicht auf DNA Ebene (amplifizierte loci, Gendosis) und auf mRNA Ebene Expressionsoptimierungen, Promoterkontrolle etc. zu verfolgen und im Screening von Mutageneseverfahren einzusetzen. TESGA könnte sich hierbei als eine wichtige Komplementärtechnik zum "cell sorting" erweisen.

### P a t e n t a n s p r ü c h e

1. Verfahren zur Bestimmung von mindestens einer in vitro-amplifizierten Nukleinsäuresequenz in einem verschlossenen Reaktionsraum, wobei während oder nach der Amplifizierung der Nukleinsäuresequenz mindestens eine Substanz vorhanden ist, deren spektroskopisch meßbare Parameter mit der nachzuweisenden Nukleinsäuresequenz in Wechselwirkung tritt, dabei ein meßbares Signal erzeugt wird, die zu messende Probe der Einwirkung eines Gradienten ausgesetzt wird, der Nukleinsäuren mindestens teilweise denaturieren kann unter Erfassung des sich durch die Einwirkung des Gradienten ändernden meßbaren Parameters.
2. Verfahren gemäß Anspruch 1, wobei die Substanz, deren spektroskopisch meßbarer Parameter mindestens ein Lumineszenz oder Fluoreszenzfarbstoff ist, einen Nukleinsäureanteil enthält und dessen Wechselwirkung mit den in vitro-amplifizierten Nukleinsäuresequenzen in Abhängigkeit des Denaturierungszustandes mit einer Änderung des spektroskopischen Meßsignals einhergeht, vorzugsweise durch Interkalation des Farbstoffes in die Nukleinsäuredoppelhelix oder durch Verdünnungs oder Konzentrierungseffekt in dem Meßkompartiment.
3. Verfahren gemäß mindestens einem der Ansprüche 1 oder 2, wobei ein Denaturierungsprozess über eine Änderung der Wellenlänge und/oder einen Lumineszenz

bzw. Fluoreszenzintensitätsshift und/oder Fluoreszenzpolarisationsänderung und/oder eine Änderung der Lebenszeit eines angeregten Zustandes oder über das Prinzip des sogenannten "Energy Transfer" oder über einen Konzentrationseffekt erfaßt wird.

4. Verfahren gemäß mindestens einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, daß in einem Reaktionsraum mehrere, spektroskopisch voneinander unterscheidbare Farbstoffe eingesetzt werden können, mit denen sich verschiedene amplifizierte Nukleinsäuren analysieren lassen und/oder über die mindestens eine unabhängige Eichsubstanz eingeführt werden kann.
5. Verfahren gemäß mindestens einem der Ansprüche 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, daß die Lumineszenz, insbesondere Fluoreszenz der Farbstoffe durch einen Laser kontinuierlich oder getaktet angeregt wird.
6. Verfahren gemäß mindestens einem der Ansprüche 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, daß die amplifizierten Nukleinsäuren mindestens einen koamplifizierten Nukleinsäure-Standard enthalten, dessen Sequenz zu einer zu bestimmenden Sequenz homolog ist, vorzugsweise identisch mit Ausnahme einer Punktmutation, die vorzugsweise in einem Sequenzbereich niedrigster Stabilität liegt, jedoch außerhalb der primer-Bindungsstellen bei enzymatischer Amplifikation.
7. Verfahren gemäß mindestens einem der Ansprüche 1 bis 5 und 6, dadurch gekennzeichnet, daß der Nukleinsäure Standard selbst ein natürlicher Bestandteil der zu analysierenden Nukleinsäure ist.



8. Verfahren gemäß mindestens einem der Ansprüche 1 bis 7, dadurch gekennzeichnet, daß die Amplifikation in homogener Phase oder mit einem Festphasenträger gekoppelten Primer durchgeführt wird, an dessen verlängerter Sequenz die markierte Sonde hybridisieren kann und deren Konzentration somit entweder gezielt auf dem Festphasenträger oder in der freien Lösung bestimmt werden kann.
9. Verfahren gemäß mindestens einem der Ansprüche 1 bis 8, dadurch gekennzeichnet, daß mindestens ein Fluoreszenzfarbstoff an ein Nukleinsäuremolekül gekoppelt ist, dessen Sequenz identisch oder homolog mit der nachzuweisenden Nukleinsäure oder dem kopolymerisierten Nukleinsäure-Standard ist.
10. Verfahren gemäß mindestens einem der Ansprüche 1 bis 9, dadurch gekennzeichnet, daß das Fluoreszenzfarbstoff-gekoppelte Nukleinsäuremolekül dem Reaktionsgemisch nach erfolgter Amplifikation zugesetzt wird, wobei die Hybridisierung mit den amplifizierten Nukleinsäuren durch einen thermischen Denaturierungsschritt mit nachfolgendem Renaturierungsschritt erfolgt.
11. Verfahren gemäß mindestens einem der Ansprüche 1 bis 4 und 9, dadurch gekennzeichnet, daß das Fluoreszenzfarbstoff-gekoppelte Nukleinsäuremolekül dem Reaktionsgemisch vor erfolgter Amplifikation zugesetzt wird wobei die Sonde als nicht amplifizierbare Doppelstrang-RNA oder als nicht amplifizierbare chemisch modifizierte Nukleinsäure zugesetzt wird.
12. Verfahren gemäß mindestens einem der Ansprüche 1 bis 11, dadurch gekennzeichnet, daß zur Amplifikation vorzugsweise ein Primer eines Primerpaares verwendet

wird, der 5'-terminal eine G:C-reiche Region kodiert von vorzugsweise 15 bis 20 G:C - Resten.

13. Verfahren gemäß mindestens einem der Ansprüche 1 bis 12, dadurch gekennzeichnet, daß Foliensysteme mit Vertiefungen oder Ausbuchtungen als Reaktionsräume verwendet werden, die thermisch verschweißbar sind und als Aufnahme für verwendungsfertige Reagenzien-gemische in lyophilisierter oder Matrix-gebundener Form dienen, sowie zur direkten optischen Vermessung geeignet sind.
14. Verfahren gemäß mindestens einem der Ansprüche 1 bis 13, dadurch gekennzeichnet, daß die vorgelegten Reagenzien in räumlich getrennten Matrices gelagert werden und nach dem Schließen eines Reaktionsraumes zeitlich getrennt dem Reaktionsgeschehen zugeführt werden können.
15. Verfahren gemäß mindestens einem der Ansprüche 1 bis 14, dadurch gekennzeichnet, daß die Reaktionsräume im Abstand der Mikrotiter - Dimension voneinander getrennt sind.
16. Verfahren gemäß mindestens einem der Ansprüche 1 bis 15, dadurch gekennzeichnet, daß das Nukleinsäuregemisch zur Analyse einem zeitlich gesteuerten Temperaturgradienten unterworfen wird mit vorzugsweise linearem Verlauf, wobei die Änderung des spektroskopischen Parameters als Funktion der Zeit und/oder der Temperatur verfolgt wird.
17. Verfahren gemäß Anspruch 16, dadurch gekennzeichnet, daß aus der Abhängigkeit des optischen Parameters mit der Temperatur und/oder der Zeit auf die Anwesenheit und/oder Anzahl und/oder Homologie einer

gesuchten Nukleinsäure zum korrespondierenden Standard geschlossen werden kann.

18. Verfahren gemäß mindestens einem der Ansprüche 1 bis 17, dadurch gekennzeichnet, daß die Auswertung der Daten on line durch ein Datenverarbeitungssystem erfolgt.
19. Vorrichtung zur Durchführung des Verfahrens gemäß einem der Ansprüche 1 bis 18, die eine rechnergesteuerte, zeitabhängige Thermostatierung der Reaktionskompartimente erlaubt.
20. Eine Vorrichtung gemäß Anspruch 19, die eine optische Einheit enthält, wobei vorzugsweise ein Laser zur Anregung eingesetzt wird sowie eine optische Detektionseinheit zur Registrierung des emittierten Fluoreszenzsignals.
21. Mittel zur Durchführung des Verfahrens gemäß mindestens einem der Ansprüche 1 bis 20, bestehend aus einem System von Reaktionskompartimenten, vorzugsweise einem Foliensystem mit gebrauchsfertigen Reagenzien in lyophilisierter Form, wobei die Reaktionskompartimente vorzugsweise in der Mikrotiter-Dimensionierung angeordnet sind.
22. Mittel zur Durchführung des Verfahrens gemäß Anspruch 21, dadurch gekennzeichnet, daß die Reagenzien in mindestens einer wasserlöslichen Matrix fixiert und/oder gelagert werden.
23. Mittel zur Durchführung des Verfahrens gemäß einem der Ansprüche 21 bis 22, wobei die Matrix Stabilisatoren enthält, vorzugsweise Zucker, insbesondere Trehalose oder Saccharose.

24. Mittel zur Durchführung des Verfahrens gemäß mindestens einem der Ansprüche 21 bis 23, wobei das Reaktionskompartiment und/oder weitere Reagenzienreservoirs Amplifikationsprimer, Pufferbestandteile, mindestens eine Polymerase und Kofaktoren enthält.
25. Mittel zur Durchführung des Verfahrens gemäß einem der Ansprüche 21 bis 24, wobei die Reaktionskompartiment-verschließende Folie mindestens ein weiteres Reagenzienreservoir in einer Matrix enthält, wobei vorzugsweise dort die markierte Sonde mit den für die Hybridisierung notwendigen Puffersubstanzen gelagert ist.
26. Mittel gemäß mindestens einem der Ansprüche 21 bis 25 in Kit-Systemen zusammengestellt.

### Z u s a m m e n f a s s u n g

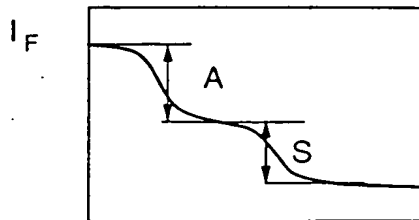
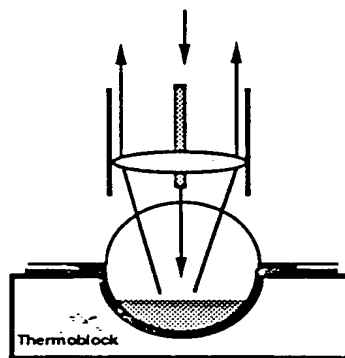
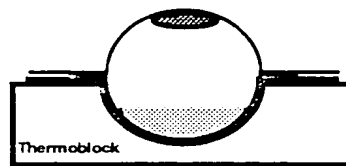
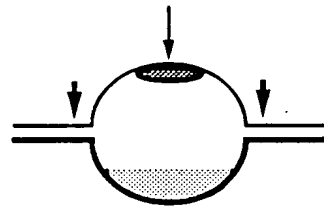
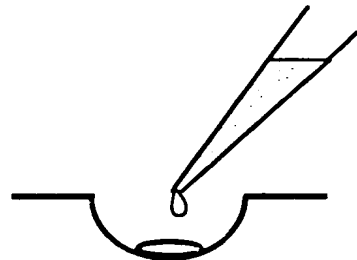
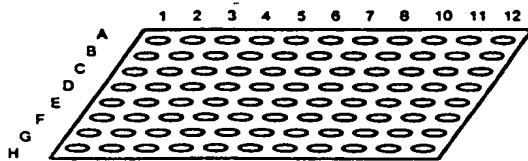
Es wird ein Verfahren beschrieben zur Bestimmung von mindestens einer in vitro-amplifizierten Nukleinsäuresequenz in einem Reaktionsraum,

wobei während oder nach der Amplifizierung der Nukleinsäuresequenz mindestens eine Substanz vorhanden ist, deren spektroskopisch meßbare Parameter mit der nachzuweisenden Nukleinsäuresequenz in Wechselwirkung tritt, dabei ein meßbares Signal erzeugt wird,

die zu messende Probe der Einwirkung eines Gradienten ausgesetzt wird, der Nukleinsäuren mindestens teilweise denaturieren kann

unter Erfassung des sich durch die Einwirkung des Gradienten ändernden meßbaren Parameters. Das erlaubt, die diagnostische Methode der DNA oder RNA Amplifikation qualitativ und quantitativ automatisch an großen Probenserien durchzuführen. Die Methode basiert auf einem Vergleich der Kopienzahl und der Sequenz einer zu analysierenden DNA oder RNA und einem internen Standard mit Hilfe eines zeitlichen Temperaturgradienten. Der Nachweis wird mit optischen Verfahren in homogenen oder heterogenen Phasen geführt und erfordert keine elektrophoretischen Trenntechniken. Der amplifizierte Reaktionsansatz kann auch während und nach der Analyse verschlossen bleiben. Damit wird z. B. eine Entsorgung unter vollständiger Vermeidung der Kontaminationsgefahr durch amplifizierte Reaktionsansätze möglich. Die analysierten Proben können über längere Zeiträume archiviert und gegebenenfalls wiederholt analysiert werden. Über eine anschließende Trennung mit der Temperatur-Gelelektrophorese (TGGE) können beliebige Varianten präparativ z.B. zum Zweck der Sequenzierung dargestellt werden.

# Das technische TESGA-Prinzip



Gedruckter  
Analysebericht

Basis Folie

Probe, ca. 50  $\mu$ l

lyophilisierte  
Amplifikations-Reagentien  
• Enzyme  
• Puffer  
• Primer

Verschußfolie mit  
markierter  
Standardnukleinsäure in  
lyophilisiertem  
Reassoziationspuffer

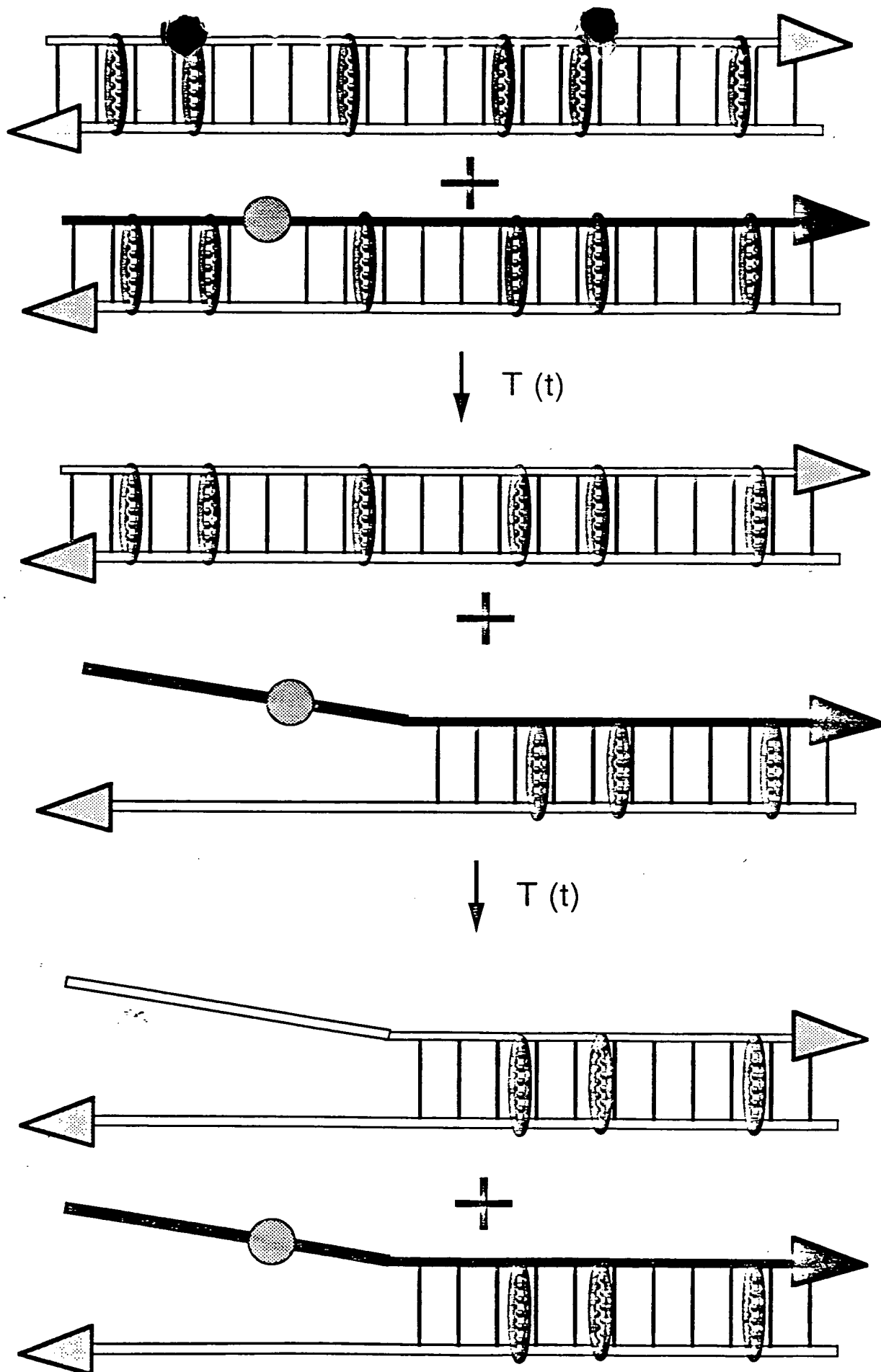
steuerbarer Thermoblock

on line - Laser  
Detektionssystem

Zeit-aufgelöste  
Fluoreszenzintensität

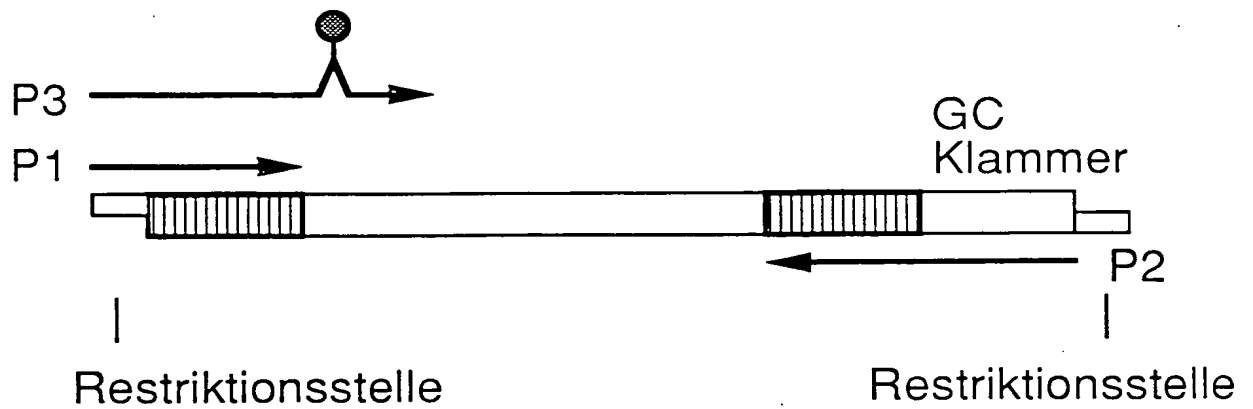
Möglichkeit zur  
Archivierung,  
Analysewiederholung,  
Entsorgung  
ohne Öffnung des  
Reaktionsraumes

Figur 1



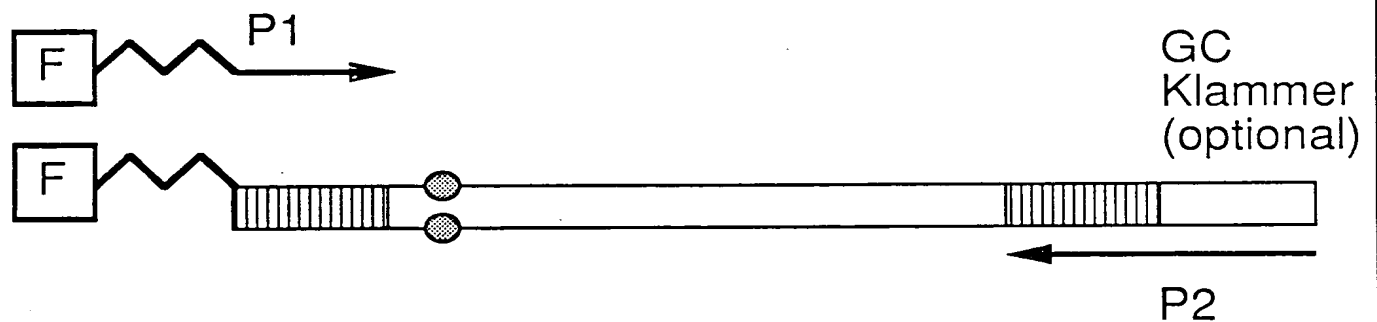
Figur 2

## TGGE Sonden-Konstruktion



~)

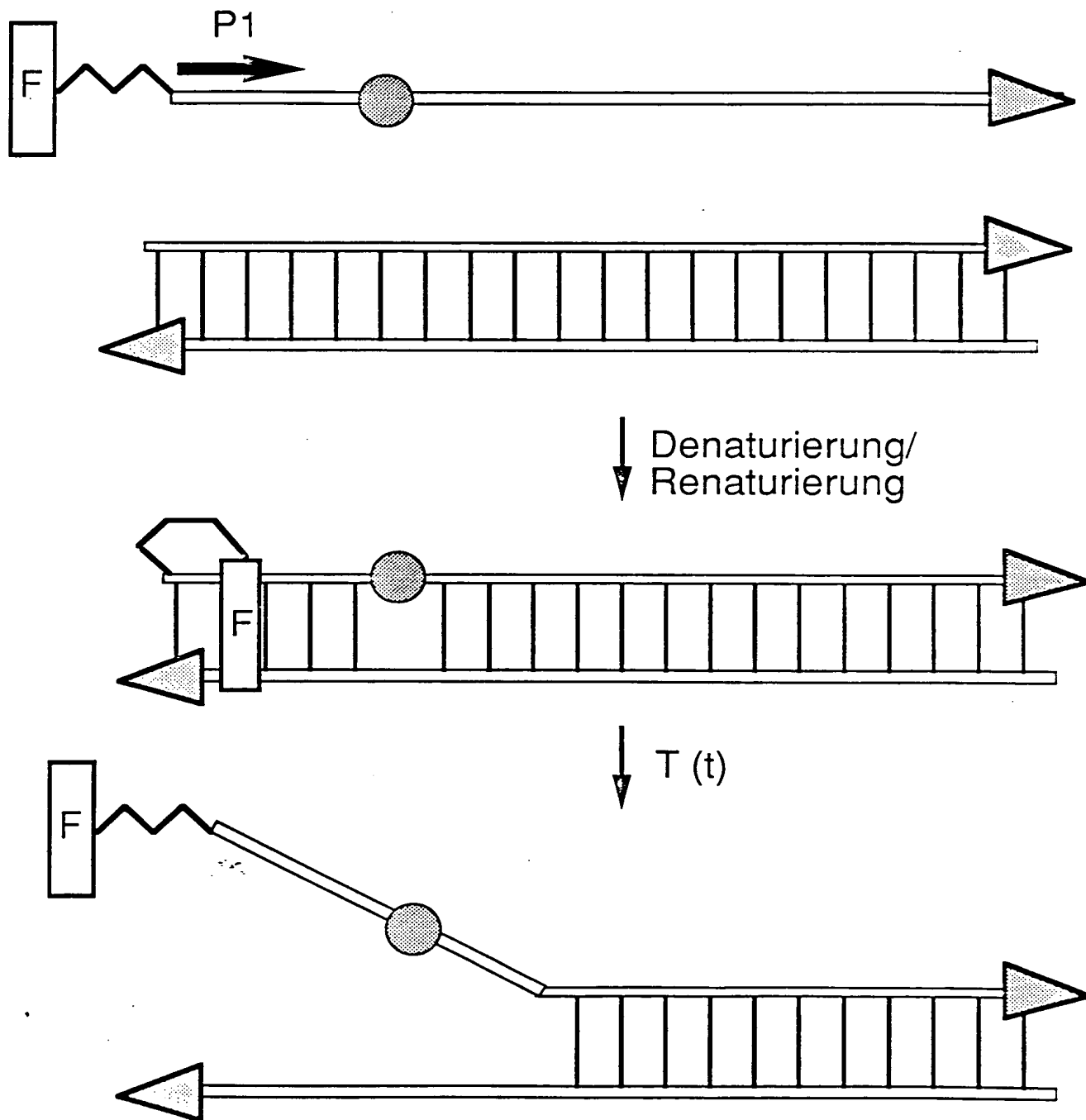
## TESGA Sonden-Konstruktion



b)

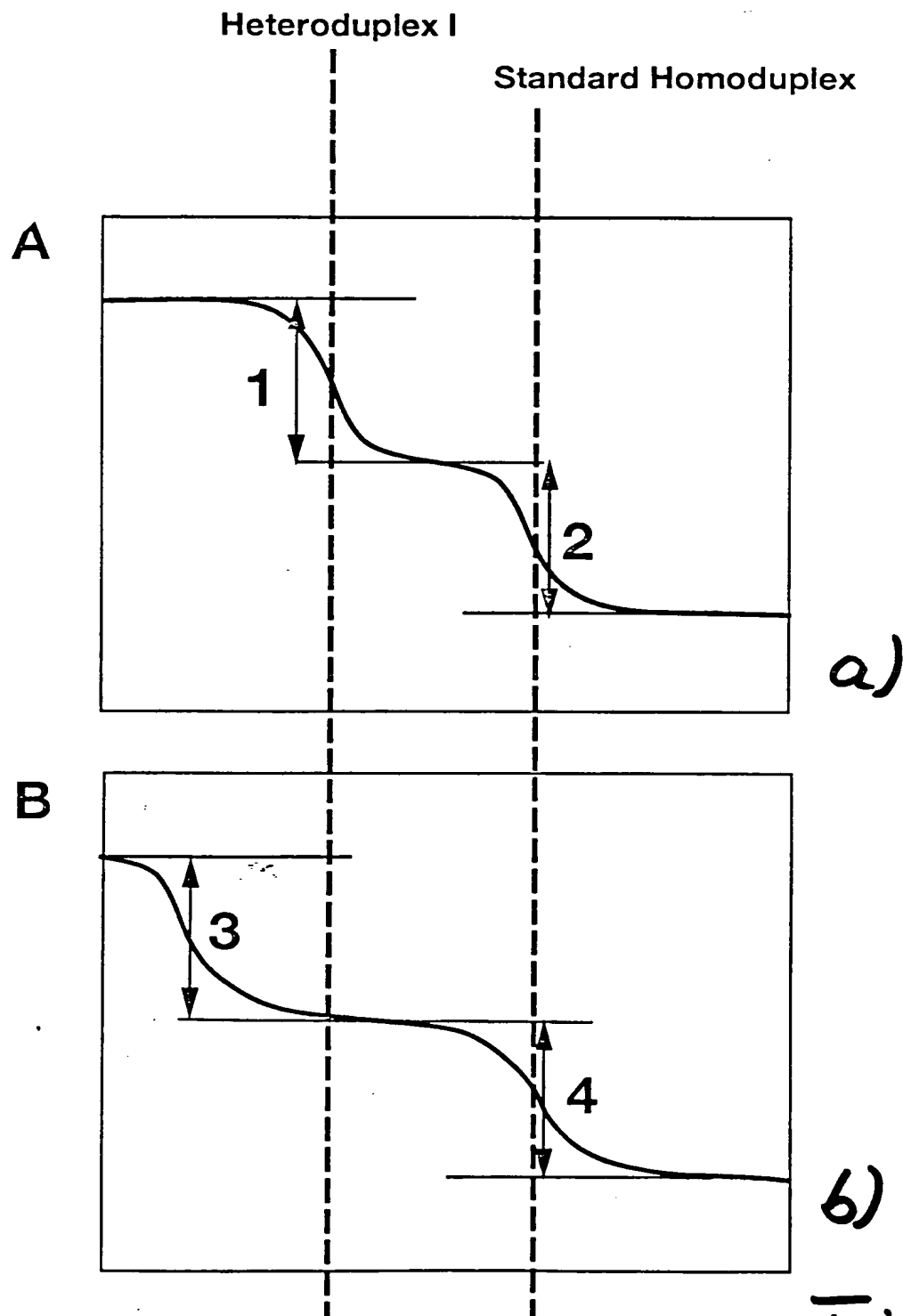
Figur 3





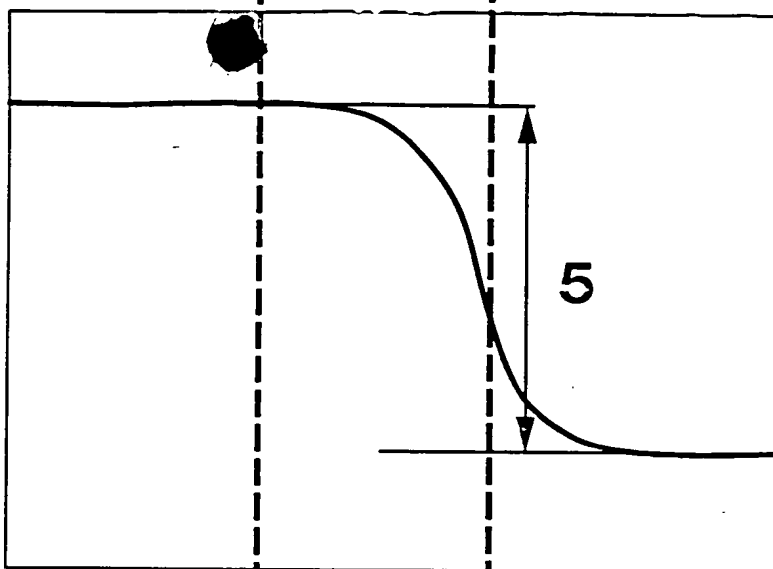
Figur 4

# Die experimentellen Ergebnisse (schematisch)



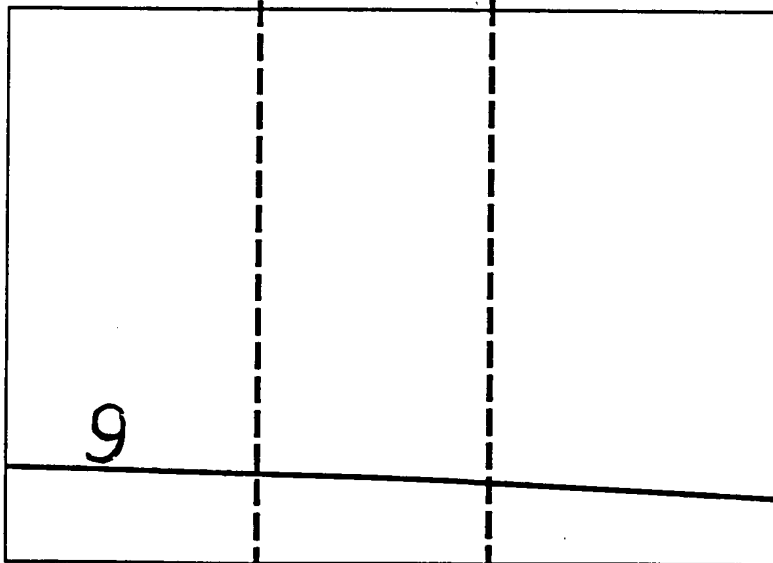
Figur 5

C



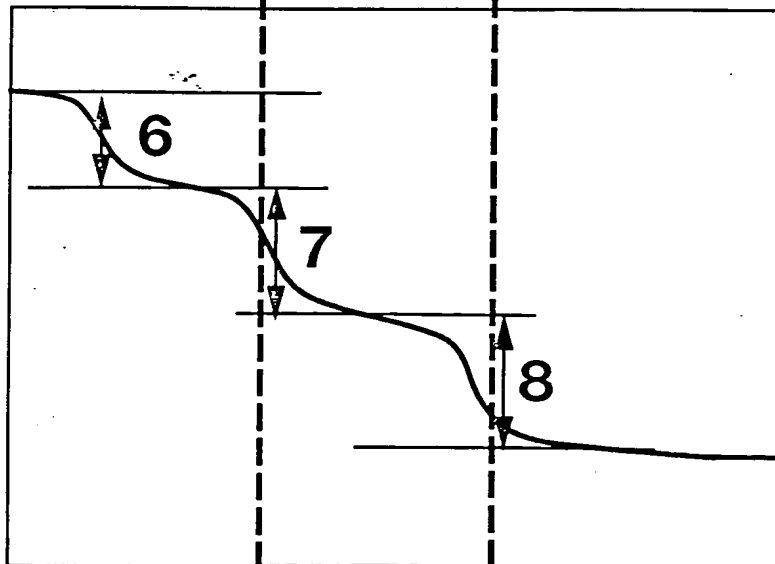
c)

D



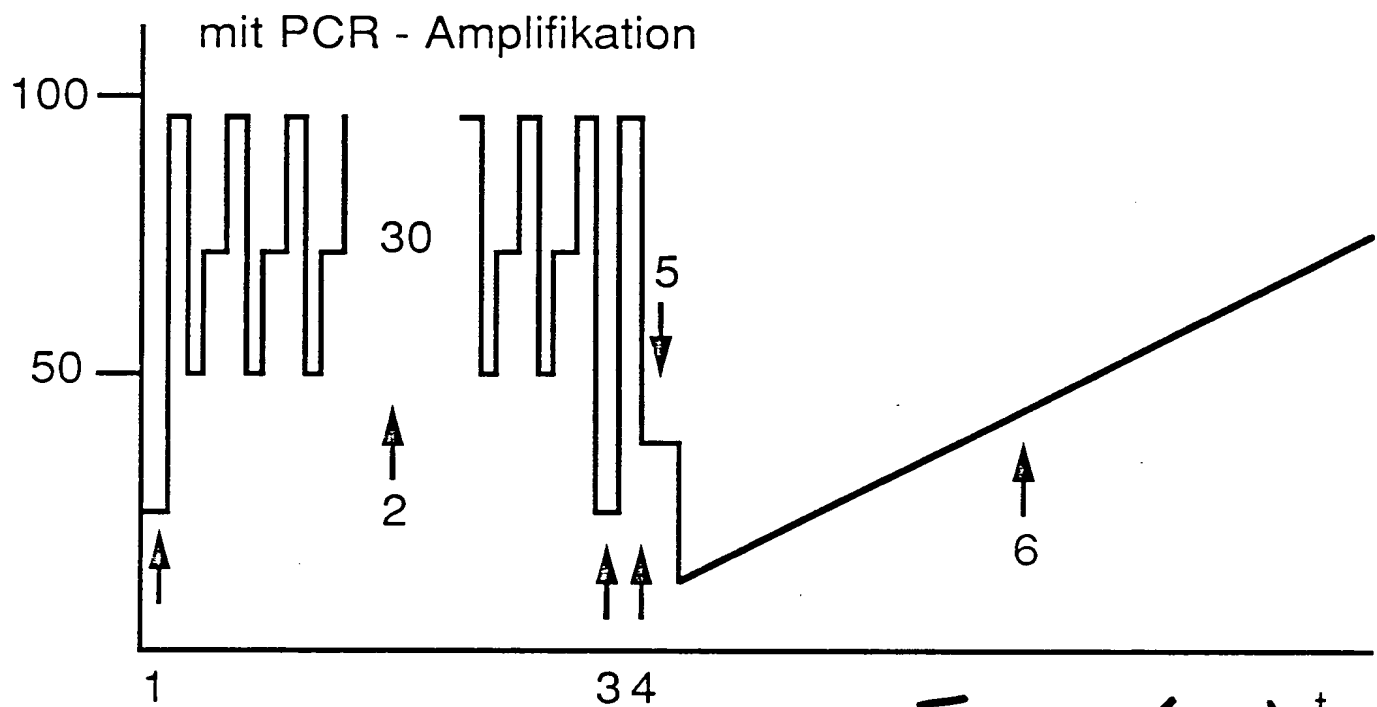
d)

E

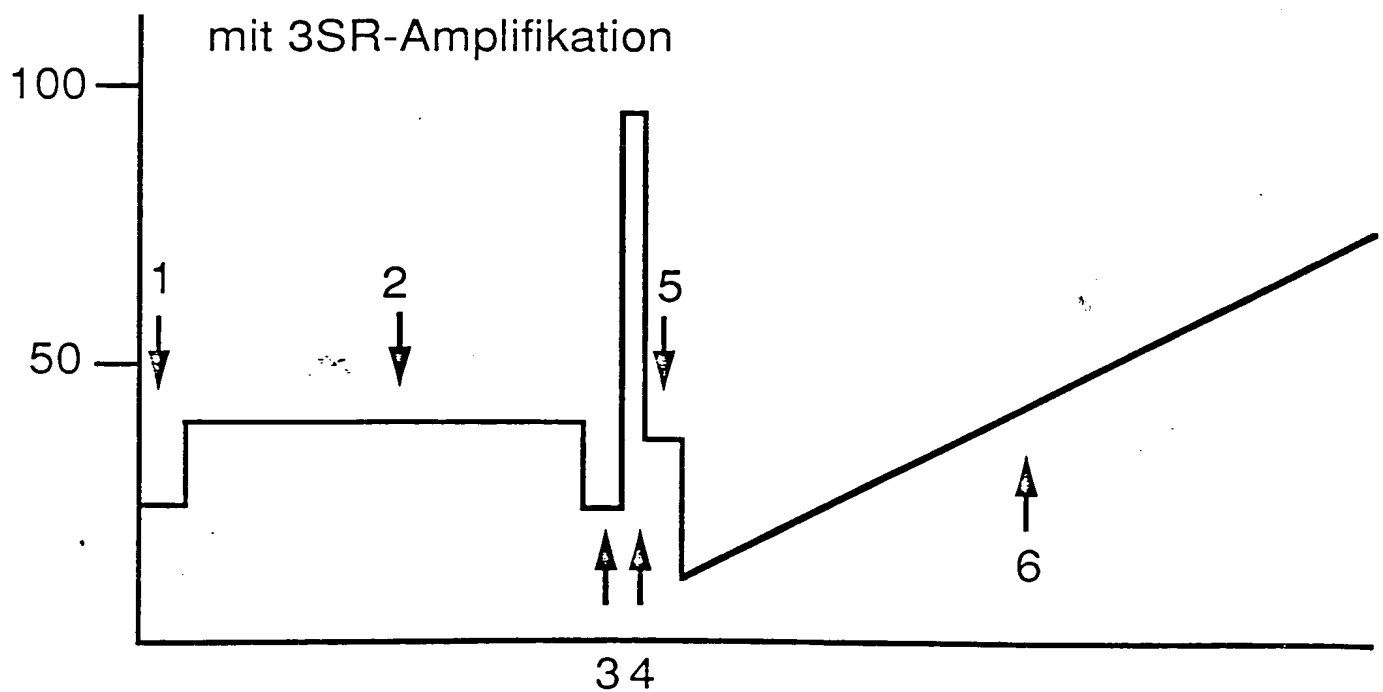


e)

# Programmablauf

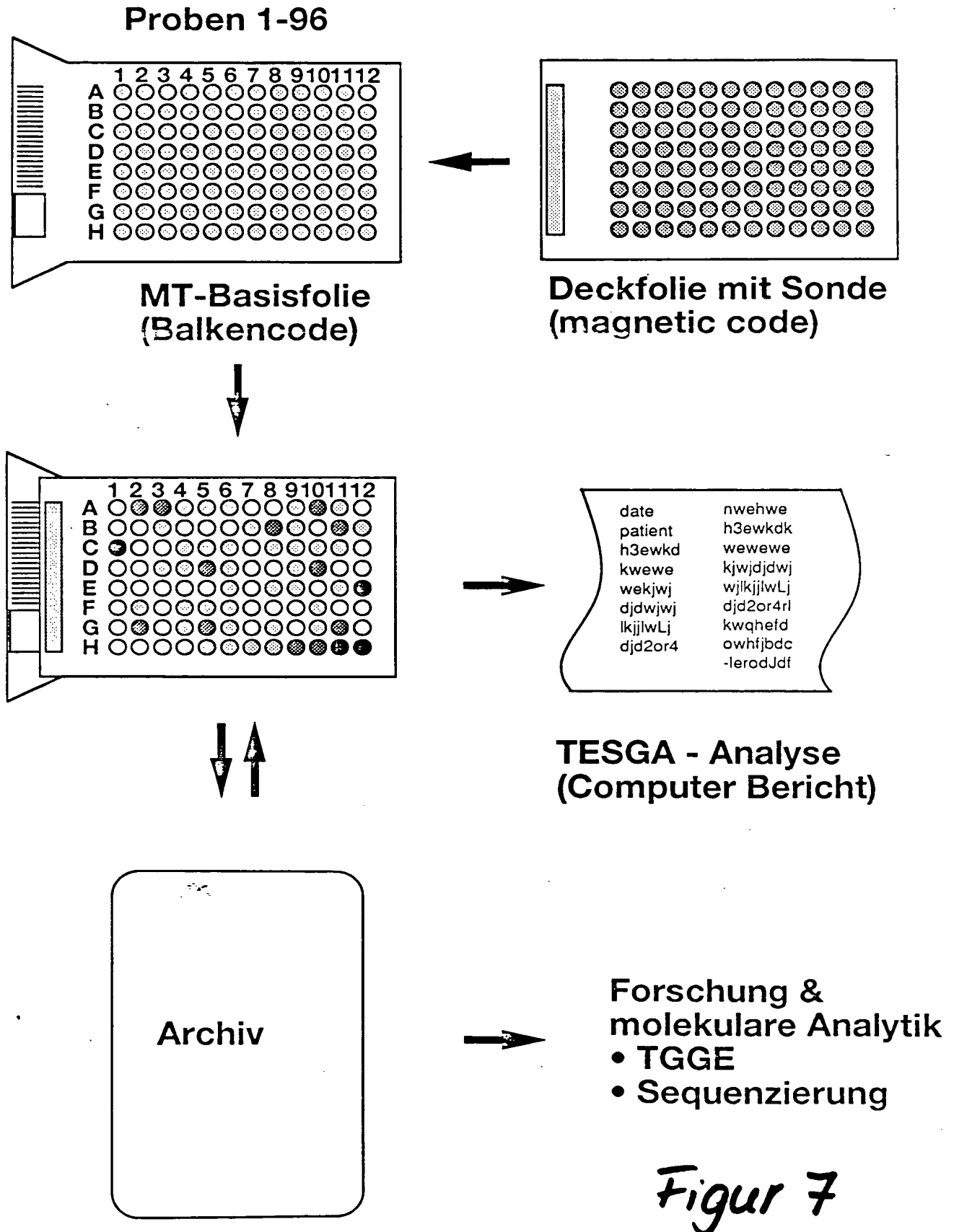


Figur 6a) <sup>t</sup>

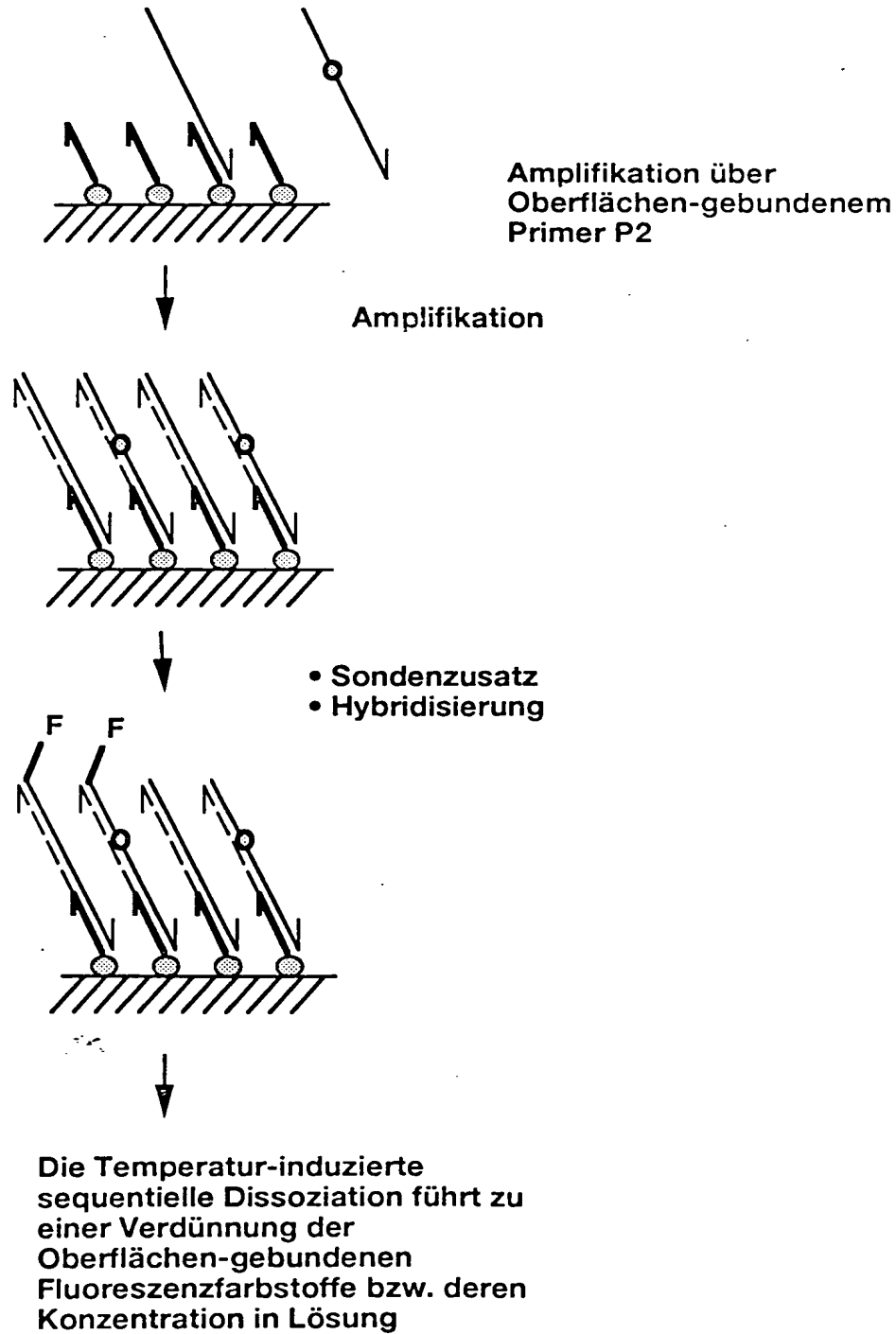


Figur 6b)

# TESGA Analytik



# Der TESGA - Verdünnungsassay



*Figur 8*